

## **CONTROL BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES DE POSTCOSECHA EN MANZANAS USANDO LA BACTERIA *Rahnella aquatilis*: PROBABLES MECANISMOS DE ACCIÓN**

Calvo, J.; Elorza, M.; Calvente, V.; Benuzzi, D. y Sanz-Ferramola, M.I. Área de Tecnología Química y Biotecnología. Facultad de Química Bioquímica y Farmacia - Universidad Nacional de San Luis- Chacabuco y Pedernera. San Luis (5700), Argentina. e-mail:dbenu@unsl.edu.ar

**RESUMEN:** el control biológico de las enfermedades criptogámicas en productos frutihortícolas almacenados, es una alternativa interesante para el reemplazo de los fungicidas químicos cuya aplicación en postcosecha se encuentra altamente restringida, sobre todo en países importadores de nuestros productos. Los microorganismos naturalmente presentes en la microbiota epífita de frutos, son potenciales agentes de control biológico (ACB) de mohos responsables de podredumbres de postcosecha tales como *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*. En trabajos anteriores demostramos la capacidad de la bacteria *Rahnella aquatilis* aislada desde piel de manzana e identificada en nuestro laboratorio para controlar los dos fitopatógenos mencionados. Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar la influencia de la concentración del antagonista (*R. aquatilis*) en la eficacia del biocontrol de ambos fitopatógenos y dilucidar un posible mecanismo de acción. Para evaluar la influencia de la concentración de *R. aquatilis* en su capacidad como ACB se realizaron pruebas in vitro y en frutos. Los ensayos in vitro se realizaron sobre portaobjetos cavados en los que se colocaron suspensiones con 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> y 10<sup>6</sup> células / ml de *R. aquatilis*, en medio GP (glucosa-peptona) que fueron desafiados con *P. expansum* y *B. cinerea* (10<sup>6</sup> conidios/ml). Se mantuvieron a 28°C y 95% de Humedad Relativa durante 24 h. Se evaluó la capacidad de biocontrol calculando el porcentaje de conidios que germinaron en cada caso, utilizando microscopio óptico y microscopio electrónico de barrido. Para los ensayos en frutos se usaron manzanas Red delicious con heridas artificiales de 3 mm de diámetro (10 manzanas con 2 heridas por manzana) que fueron inoculadas con 20 µl de cada una de las suspensiones antes descritas de antagonista y fueron desafiadas con los fitopatógenos. Se mantuvieron 28°C y luego de 6 días, se midieron los diámetros de podredumbre y se calculó el porcentaje de reducción de severidad de la misma ( $R\% = \{ \text{Diámetro testigo} - \text{Diámetro tratamiento} / \text{Diám. testigo} \} 100$ ). Se registró también la incidencia de la enfermedad (IE % de heridas infectadas). Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Para la evaluación de mecanismos de acción se diseñó una experiencia en placas de cultivo en las que se insertaron cilindros de vidrio que tenían como base una membrana hidrofílica con 0.2 µm de diámetro de poro. Los cilindros control poseían base de vidrio. Previamente se evaluó el pasaje de fluidos a través de la membrana colocando de un lado de la misma un colorante (azul de metileno) que rápidamente se distribuyó por todo el sistema. La placa de cultivo se llenó con medio GP con 10<sup>6</sup> células/ml de *R. aquatilis* y dentro de los cilindros se colocaron suspensiones de *P. expansum* ó *B. cinerea* (10<sup>6</sup> conidios / ml) en el mismo medio de cultivo. Se incubaron a 28 °C por 24 h. Se contaron 100 conidios y se calculó el porcentaje de los que germinaron. En los cultivos en portaobjetos se observó que 10<sup>5</sup> células/ml de *R. aquatilis* impidieron totalmente la germinación tanto de los conidios de *B. cinerea* como de los de *P. expansum* ( 10<sup>6</sup> conidios / ml en los dos casos). Los ensayos con manzanas mostraron que: *R. aquatilis* en concentración de 10<sup>6</sup> células/ml redujo la severidad de las lesiones causadas por los patógenos en un 50% para *B. cinerea* y 60% para *P. expansum*, mientras que la Incidencia de la Enfermedad se

redujo en ambos casos al 50%. De estos ensayos se concluyó que la bacteria *R. aquatilis* tiene capacidad para antagonizar los mencionados fitopatógenos aun en concentraciones menores que las reportadas para otras bacterias (10<sup>8</sup> células/ml). En los ensayos realizados utilizando membrana hidrofílica para impedir el contacto directo entre el antagonista y el patógeno se observó un 100 % de germinación de los conidios obteniéndose igual resultado en los cilindros con base de vidrio (control). De estos resultados se concluyó que para inhibir la germinación de conidias de cualquiera de los dos patógenos el antagonista requiere un contacto directo. En el caso de *B. cinerea* las imágenes obtenidas muestran a las bacterias rodeando a cada conidia. Este taxismo se explicaría por la propiedad de las conidias de *B. cinerea* de almacenar nutrientes que le permiten germinar aún en agua destilada, dichos nutrientes atraerían a la bacteria que al consumirlos, impediría su germinación. En el caso de *P. expansum* las bacterias permanecen distribuidas en forma homogénea, sin rodear a las conidias, por lo que se puede suponer que el antagonismo en este caso se debe a una competencia por espacio más que por nutrientes ya que la bacteria alcanzó en corto tiempo una población de 10<sup>9</sup> células/ml. De estos ensayos se pudo inferir también que en las condiciones en que se cultivó el antagonista, no produjo ningún compuesto antifúngico que pudiera difundir a través de la membrana utilizada. En la actualidad, además de estar estudiando distintos aspectos para mejorar el control de las diferentes podredumbres por *R. aquatilis* a través de la competencia, estamos investigando la posibilidad de la producción de agentes antifúngicos por parte de la bacteria y probando su comportamiento en consorcios microbianos.